

# Espacenet

## Bibliographic data: JP 2002275175

(A)

### FLAVONOID COMPOUND AND METHOD OF PRODUCING THE SAME

**Publication date:** 2002-09-25

**Inventor(s):** MIYAKE YOSHIKI; OSAWA TOSHIHIKO; MINATO KENICHIRO ±

**Applicant(s):** POKKA CORP; UNIV NAGOYA; JAPAN SCIENCE & TECH CORP ±

**Classification:**

- international: **A23L1/30; A61K31/352; A61K31/353; A61P31/12; A61P37/08; A61P9/14; C07D311/32; C12P17/06; C12R1/66;** (IPC1-7): A23L1/30; A61K31/353; A61P31/12; A61P37/08; A61P9/14; C07D311/32; C12P17/06; C12P17/06; C12R1/66
- European:

**Application number:** JP20010073577 20010315

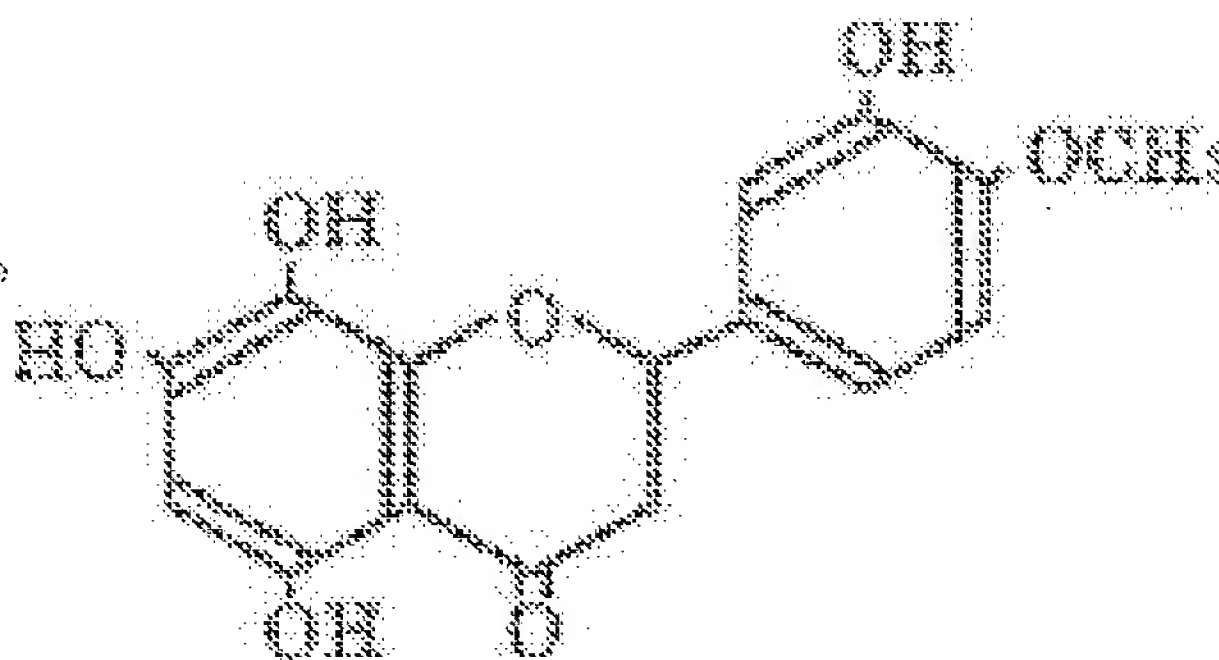
**Priority number (s):** JP20010073577 20010315

**Also published as:**

- [JP 3967554 \(E2\)](#)

### Abstract of JP 2002275175 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a new flavonoid compound and method of producing the same capable of expanding the utilization range of a hesperidin. **SOLUTION:** This flavonoid derivative is an 8-hydroxyhesperitin having structure expressed by formula 1 having a hydroxyl group on the 8th position of the hesperitin. This flavonoid compound is obtained through a microorganism fermentation process of hesperidin by *Aspergillus saitoi*. The microorganism fermentation process comprises a hyphal culture process producing hesperitin on the vegetative hypha of the *Aspergillus* by a shaking culture of a medium including the hesperidin and the *Aspergillus* and a sporulation process producing the 8-hydroxyhesperitin while spore forming from the vegetative hypha of the *Aspergillus*.



(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* ( 参考 )
C 0 7 D 311/32		C 0 7 D 311/32	4 B 0 1 8
C 1 2 P 17/06		C 1 2 P 17/06	4 B 0 6 4
// A 2 3 L 1/30		A 2 3 L 1/30	Z 4 C 0 6 2
A 6 1 K 31/353		A 6 1 K 31/353	4 C 0 8 6
A 6 1 P 9/14		A 6 1 P 9/14	
審査請求 未請求 請求項の数 4 O L ( 全 6 頁 ) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2001-73577(P2001-73577)	(71) 出願人	591134199 株式会社ボッカコーポレーション 愛知県名古屋市東区代官町35番16号
(22) 出願日	平成13年 3 月15日 (2001. 3. 15)	(71) 出願人	391012224 名古屋大学長 愛知県名古屋市千種区不老町 ( 番地なし )
		(71) 出願人	396020800 科学技術振興事業団 埼玉県川口市本町 4 丁目 1 番 8 号
		(74) 代理人	100068755 弁理士 恩田 博宣 ( 外 1 名 )
		最終頁に続く	

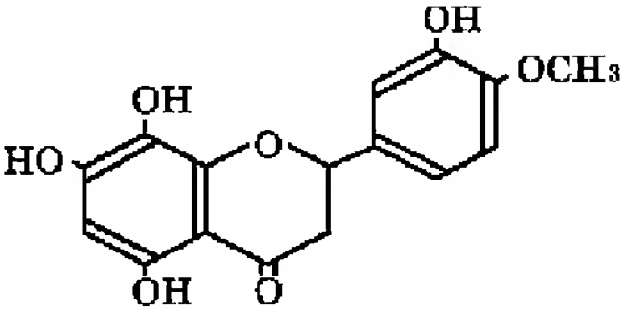
(54) 【発明の名称】 フラボノイド化合物及びその製造方法

(57) 【要約】

【課題】 ヘスペリジンの利用範囲の拡大を図ることができる新規なフラボノイド化合物及びその製造方法を提供する。

【解決手段】 フラボノイド化合物は、下記化1で示される構造を有し、ヘスペレチンの8位に水酸基を備えた8-ヒドロキシヘスペレチンである。このフラボノイド化合物は、ヘスペリジンのアスペルギルス・サイトイ (Aspergillus saitoi) にて微生物発酵処理することによって得られる。前記微生物発酵処理は、ヘスペリジンとアスペルギルスとを含む培地を振盪培養し、アスペルギルスの栄養菌糸にヘスペレチンを生成させる菌糸培養工程と、アスペルギルスの栄養菌糸から胞子形成を進行させながら8-ヒドロキシヘスペレチンを生成させる胞子形成工程とから構成される。

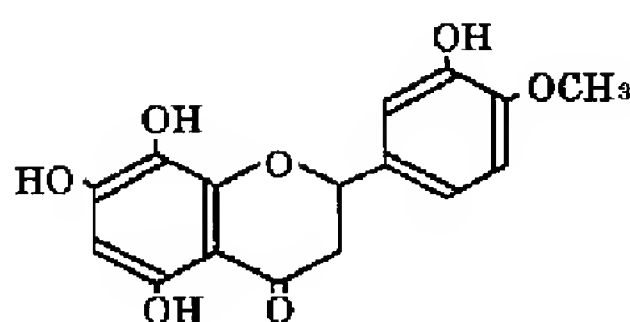
【化1】



【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記化1で示される構造を有するフラボノイド化合物。

【化1】



【請求項2】 アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) を用いて、ヘスペリジンを微生物発酵処理することにより得られることを特徴とする請求項1に記載のフラボノイド化合物。

【請求項3】 請求項1又は請求項2に記載のフラボノイド化合物を製造するフラボノイド化合物の製造方法であって、

ヘスペリジンをアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) にて微生物発酵処理することにより、前記ヘスペリジンを微生物変換してフラボノイド化合物を生成させることを特徴とするフラボノイド化合物の製造方法。

【請求項4】 前記微生物発酵処理は、ヘスペリジンとアスペルギルス・サイトイとを含む培地を振盪培養し、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸にヘスペリジンからヘスペレチンを微生物変換させる菌糸培養工程を行った後、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸から孢子形成を進行させつつ、前記培地中のヘスペレチンからフラボノイド化合物を微生物変換させる孢子形成工程を行うように構成したことを特徴とする請求項3に記載のフラボノイド化合物の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は新規なフラボノイド化合物及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来より、ヘスペレチンの配糖体であるヘスペリジンは、オレンジやレモン等の柑橘類、特に未熟果の果皮に多く含まれるフラボノイドであり、ビタミンPとして知られている。このヘスペリジンは、抗アレルギー作用、抗ウィルス作用、毛細血管強化作用等の生理活性を有することが知られており、健康食品等に添加して利用されている。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】天然に多く存在するヘスペリジンの有効利用の一環として、ヘスペリジンを物質変換することにより、その利用範囲のより一層の拡大を見込める可能性が高い。特に、前記ヘスペリジンは体内への吸収性があまり高くないことから、物質変換によ

って栄養的な観点からの価値の向上が期待される。

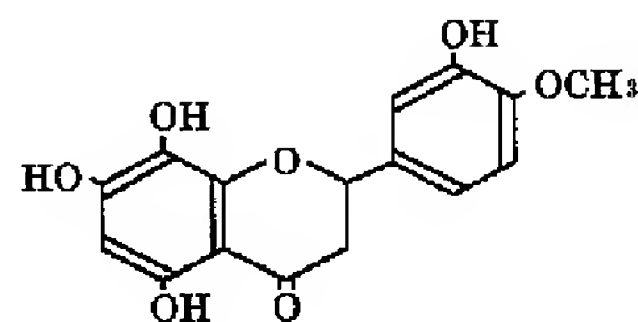
【0004】この発明は、前記ヘスペリジンのさらなる利用拡大を目指した鋭意研究の結果なされたものである。この発明の目的とするところは、ヘスペリジンの利用範囲の拡大を図ることができる新規なフラボノイド化合物及びその製造方法を提供することにある。

【0005】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、請求項1に記載の発明のフラボノイド化合物は、下記化2で示される構造を有するものである。

【0006】

【化2】



請求項2に記載の発明のフラボノイド化合物は、請求項1に記載の発明において、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) を用いて、ヘスペリジンを微生物発酵処理することにより得られることを特徴とするものである。

【0007】請求項3に記載の発明のフラボノイド化合物の製造方法は、請求項1又は請求項2に記載のフラボノイド化合物を製造するフラボノイド化合物の製造方法であって、ヘスペリジンをアスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus saitoi*) にて微生物発酵処理することにより、前記ヘスペリジンを微生物変換してフラボノイド化合物を生成させることを特徴とするものである。

【0008】請求項4に記載の発明のフラボノイド化合物の製造方法は、請求項3に記載の発明において実施され、前記微生物発酵処理は、ヘスペリジンとアスペルギルス・サイトイとを含む培地を振盪培養し、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸にヘスペリジンからヘスペレチンを微生物変換させる菌糸培養工程を行った後、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸から孢子形成を進行させつつ、前記培地中のヘスペレチンからフラボノイド化合物を微生物変換させる孢子形成工程を行うように構成したことを特徴とするものである。

【0009】なお、前記菌糸培養工程後の孢子形成工程は、そのまま振盪培養しても、静置培養に切り替えてもどちらでもよい。但し、静置培養する場合には、培地の深さを浅くして培地の体積に対する表面積の割合（比表面積）を大きくすることにより、培地全体を好氣的条件に保ち、アスペルギルス・サイトイによる微生物変換効率を高めるように構成するのが好ましい。

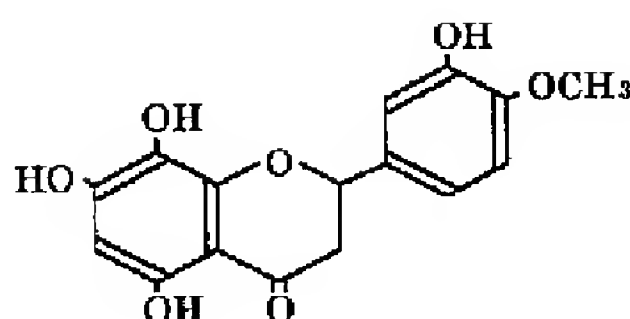
【0010】

【発明の実施の形態】以下、この発明を具体化した実施形態を詳細に説明する。実施形態のフラボノイド化合物

は、下記化3で示される構造を有している。

【0011】

【化3】



このフラボノイド化合物は、化学式が $C_{16}H_{14}O_7$ で、分子量が約319のフラボノイド化合物（3',5,7,8-tetrahydroxy-4'-methoxyflavanone 又は 2,3-dihydro-5,7,8-trihydroxy-2-(3-hydroxy-4-methoxyphenyl)-4H-1-benzopyran-4-one）である。このフラボノイド化合物は、上記化3で示される構造より、ヘスペレチン（hesperetin; 3',5,7-trihydroxy-4'-methoxyflavanone;  $C_{16}H_{14}O_6$ ）の8位に水酸基を備えた有機化合物、いわゆる8-ヒドロキシヘスペレチン（8-hydroxyhesperetin）である。

【0012】この8-ヒドロキシヘスペレチンは、メタノール、エタノール及びジメチルスルフォキシド（DMSO）に可溶で、若干溶解性が悪いが水にも可溶である。さらに、前記ヘスペレチンには抗酸化作用がほとんど見られないのに対し、この8-ヒドロキシヘスペレチンは $\alpha$ -トコフェロール（ビタミンE）と同等の極めて高い抗酸化作用を発揮することができる。そして、この高い抗酸化作用を利用して、例えば食品や飲料等に添加して健康増進活性を有する健康食品や健康ドリンク等を利用することができる。このとき、8-ヒドロキシヘスペレチンは、生体内で活性酸素を消去して過酸化脂質の生成を抑制し、酸化ストレスに起因する癌、動脈硬化、糖尿病の合併症等の生活習慣病の予防に役立つ。

【0013】この8-ヒドロキシヘスペレチンは、ヘスペリジン（hesperidin）をアスペルギルス・サイトイ（*Aspergillus saitoi*）にて微生物発酵処理することによって得られる。すなわち、この8-ヒドロキシヘスペレチンは、ヘスペレチンとルチノース（L-ラムノシル-D-グルコース）との配糖体であるヘスペリジン（ビタミンP）を含有する培地中でアスペルギルス・サイトイを培養し、そのアスペルギルス・サイトイにヘスペリジンを微生物変換させることにより、その培養上澄み液中に生成される。なお、このときの培養条件としては、アスペルギルス・サイトイの生育及び前記微生物変換を良好に行うために、20～40℃の培養温度、好氣的条件であるのが好ましい。

【0014】前記培地としては、ポテトデキストロース含有培地やツァベック培地等の糸状菌用培地又はオカラ等の有機物を含有する種々の液体培地が好適に使用される。さらに、ヘスペリジンから8-ヒドロキシヘスペレチンを微生物変換させる目的以外の発酵を阻害するよう

に、必要最小限の栄養素を含有する最小培地であるのが好ましく、例えばアルコール発酵しないように単糖類及び二糖類が培地中に含まれないようにするのが好ましい。また、前記培地は、培養開始時点では、アスペルギルス・サイトイの生育を良好にするために、pH3～7の範囲内であるのが好ましい。

【0015】さらに、この培養開始時の培地中には、ヘスペリジンの溶解性を高める目的で、低濃度の有機溶媒が含有されるのが好ましい。前記有機溶媒としては、メタノール、エタノール、DMSO等が挙げられるが、ヘスペリジンの溶解性を高めることができるため、DMSOが最も好適に使用される。なお、この培地中のDMSOの含有量としては、好ましくは0.01～5容量%、より好ましくは0.01～1容量%である。この培地中のDMSOの含有量が0.01容量%未満の場合には、培地中に充分な量のヘスペリジンを溶解させることができない。逆に5容量%を越える場合には、アスペルギルス・サイトイの生育が著しく阻害される。

【0016】一方、培養開始時に培地中に添加されるヘスペリジンの含有量としては、多量の8-ヒドロキシヘスペレチンを効率よく得るために、その溶解限界としての飽和濃度まで含有させるのが好ましい。なお、前記飽和濃度は、前記DMSO等の有機溶媒の含有量と深く関連しているが、およそ0.3重量%以下である。また、培養開始時に培地中に添加されるアスペルギルス・サイトイの濃度としては、多量の8-ヒドロキシヘスペレチンを短期間で効率よく得るために、 $2 \times 10^6$ 個/mL（cfu/mL）以上であるのが好ましい。

【0017】さらに、このアスペルギルス・サイトイによる微生物変換効率を高めるために、前記培地中でアスペルギルス・サイトイの栄養菌糸を振盪培養する菌糸培養工程を行った後、その栄養菌糸から胞子形成を進行させる胞子形成工程を行うように構成するのが好ましい。

【0018】菌糸培養工程は、ヘスペリジンを含む培地中でアスペルギルス・サイトイを振盪培養することによって、好氣的条件を保ちつつ栄養菌糸による微生物変換を行わせる工程である。この工程において、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸は、ヘスペリジンを構成するヘスペレチンとルチノースとの結合を切断してヘスペレチンを生成するグリコシダーゼ反応を極めて効率的に行う。前記振盪培養における振盪速度としては、50～200rpm/分の範囲内であるのが好ましい。この振盪速度が50rpm/分未満の場合には、アスペルギルス・サイトイを含有した培地全体が好氣的でないため、菌糸の増殖が充分にできない。逆に振盪速度が200rpm/分を越える場合には、培地の揺れが激しく、菌糸形成が充分にできない。

【0019】なおこのとき、培地中に添加されるヘスペリジンの含有量は、前記溶解限界を超えて添加されても構わない。このとき、培養開始時点では溶解されずに培



養容器の底部に沈澱していたヘスペリジンが振盪による攪拌作用により適宜培地中に溶解されて微生物発酵に利用され得る。さらに、培地中に溶解限界を超えてヘスペリジンを含む場合には、培養容器底部のヘスペリジンの沈澱を防ぐ目的で、50rpm/分程度で沈澱が消失するまで振盪培養するように構成するのが好ましく、その結果としてより多くのヘスペレチンを生成させることができる。

【0020】孢子形成工程は、培地中に充分量のヘスペレチンが生成された後に行われ、前記菌糸培養工程後の培地をそのまま培地交換せずに静置培養又は振盪培養することによって、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸に孢子形成を進行させながら微生物変換を行わせる工程である。なお、菌糸培養工程から孢子形成工程に移行するタイミングとしては、菌糸培養工程の終了時期に、培地の表面（液面）にアスペルギルス・サイトイの栄養菌糸が密に存在するのが目視にて確認可能となることから、それを指標にして容易に把握することができる。

【0021】この工程において、アスペルギルス・サイトイの栄養菌糸は、孢子形成を進行させながら、ヘスペレチンの8位に水酸基を付加させるヒドロキシラーゼ反応を行って8-ヒドロキシヘスペレチンを極めて効率的に生成させる。この8-ヒドロキシヘスペレチンの生成反応は、培養容器内における孢子形成過程の中期から後期にかけて最も効率的に行われ、孢子形成が完了した段階における生成効率はさほど高くはない。このため、無駄に浪費される時間を減らすために、培養容器の液面全体が孢子で完全に被覆される直前に培養を停止し、生成された8-ヒドロキシヘスペレチンを抽出するとよい。

【0022】また、この孢子形成工程において静置培養を行う場合には、振盪時の物理的刺激による孢子形成の抑制効果を容易に解消することができる。なお、この静置培養時には、培地の深さを浅くして培地の体積に対する表面積の割合（比表面積）を大きくすることにより、培地全体を好氣的条件に保ち、アスペルギルス・サイトイの活動を活発化させてその微生物変換効率を高めるように構成するのが好ましい。一方、孢子形成工程において振盪培養を行う場合には、培地の深さを適度に深くしても好氣的条件を保つことが容易であることから、一度の培養操作により多量の8-ヒドロキシヘスペレチンを生成させることが可能となる。

【0023】最後に、上記培養上澄み液又は前記孢子形成工程後の培地から8-ヒドロキシヘスペレチンを抽出して精製する。このとき、前記培地をアスペルギルス・サイトイの細胞膜が破壊されない程度に遠心分離（3000rpm程度）して上澄み画分を得、その上澄み画分を疎水性カラムによる逆相液体クロマトグラフィーにより精製するとよい。なお、前記遠心分離後の沈澱画分にも比較的多量の8-ヒドロキシヘスペレチンが含まれていることから、その沈澱画分にメタノールやエタノール

等の有機溶媒を加えて十分に洗浄しながら抽出した後、その抽出液を逆相液体クロマトグラフィーにて精製するように構成するとよい。

【0024】上記実施形態によって発揮される効果について、以下に記載する。

・ 実施形態のフラボノイド化合物は、上記化3で示される構造を有する8-ヒドロキシヘスペレチンである。この8-ヒドロキシヘスペレチンは、ヘスペレチンの8位に水酸基が付加された新規な構造を有することから、ヘスペリジンの利用範囲の拡大を図ることが可能である。さらに、この8-ヒドロキシヘスペレチンは、ヘスペリジン及びヘスペレチンと比べて著しく高い抗酸化作用を発揮することができることから、生体内で活性酸素を消去して過酸化脂質の生成を抑制し、酸化ストレスに起因する癌、動脈硬化、糖尿病の合併症等の生活習慣病の予防に役立てることができる。また、原料として柑橘類に含まれている天然成分であるヘスペリジンを用いるとともに、焼酎等の酒類の醸造に利用されるアスペルギルス・サイトイが用いられていることから、人体への摂取においてもほとんど問題がない。

【0025】・ 実施形態のフラボノイド化合物（8-ヒドロキシヘスペレチン）の製造方法は、ヘスペリジンのアスペルギルス・サイトイにて微生物発酵処理することにより、前記ヘスペリジンを微生物変換して得られるものである。このため、ヘスペリジンの利用範囲の拡大を図ることができる新規なフラボノイド化合物を極めて容易に製造することができる。さらに、前記微生物発酵処理において、ヘスペリジンとアスペルギルス・サイトイを含む培地を振盪培養する菌糸培養工程を行った後に孢子形成工程を行うように構成することによって、非常に簡単な作業工程で、8-ヒドロキシヘスペレチンを極めて効率的に製造することが可能となる。

【0026】

【実施例】以下、前記実施形態を具体化した実施例及び比較例について説明する。

＜ヘスペリジン変換物の製造＞ポテトデキストロースブロス培地（DIFCO社製）を複数個の三角フラスコ（容積500mL）に100mLずつ分取し、オートクレーブ滅菌（121℃、15分間）を行った。冷却した後に、 $2 \times 10^8$ 個/mL以上の濃度に調製したアスペルギルス・サイトイの孢子懸濁液を1.0mLずつ各フラスコに接種し、30℃の恒温槽（大気と同じ成分の好氣的条件）内において100rpm/分で振盪培養を行いながら栄養菌糸を育成させた。なお、前記アスペルギルス・サイトイは、(財)応用微生物学研究奨励会（通称IAM）より分譲を受けたアスペルギルス・サイトイ菌株（IAM No. 2210）が用いられた。

【0027】10日間振盪培養を行って栄養菌糸を十分に生育させた後、オートクレーブ滅菌（105℃、5分間）した10重量%のヘスペリジン（SIGMA社製）

DMSO希釈液を5mLずつ加え、引続き同好氣的条件下で振盪培養を行なって、栄養菌糸からの孢子形成を進行させた。なお、このときの孢子形成の様子を経時的にモニタリングしたところ、ヘスペリジン投入しておよそ1週間経過後から孢子の形成が始まり、3週間後には培地の液面全体で孢子の形成が認められたことが分かった。

【0028】本実験では、孢子形成が完全に終了する前でヘスペリジン投入後から2週間経過した時点、すなわち孢子形成の中期から後期と思われる時期のサンプルを採取した。そして、この採取されたサンプルを遠心分離（3000rpm、15分間）して不純物を沈澱除去した後、その上澄み液を分析用高速液体クロマトグラフィー（HPLC）（島津製作所製のLC10A、カラムはYMC社製のA303）にて分析し、フラボノイド組成の変化を調べた。その結果、フラボノイド組成物全体に占めるヘスペリジン変換物のピークの割合はおよそ8.3%であることが分かった。

【0029】最後に、前記ヘスペリジン変換物を含有することが確認されたHPLC用サンプルの残りをエバポレーターにて濃縮した後、分取用HPLC（島津製作所製のLC8A、カラムはYMC社製のR353-151A、SH343-5）にて分画し、ヘスペリジン変換物の単離精製を行った。

【0030】＜構造決定＞上記＜ヘスペリジン変換物の製造＞で得られたヘスペリジン変換物の構造決定を行った。<sup>1</sup>H NMR及び<sup>13</sup>C NMRスペクトルは、内部標準としてDMSO-d<sub>6</sub>に溶解させたテトラメチルシラン（Tetramethylsilane; TMS）を用いてJEOL JNM-EX-400 NMR装置（<sup>1</sup>H NMRは400MHz、<sup>13</sup>C NMRは100MHz）で分析した。また、質量スペクトル（FAB-MS）は、JEOL JMS-DX-705Lで測定した。結果を表1及び表2に示す。

【0031】

【表1】

<sup>1</sup> H NMR (δ)	
11.73	(1H, s, 5-OH)
10.39	(1H, s, b, 8-OH)
9.03	(1H, s, b, 3'-OH)
8.06	(1H, s, b, 7-OH)
6.99	(1H, d, J = 1.6Hz, H-2')
6.96	(1H, d, J = 8.4Hz, H-5')
6.93	(1H, dd, J = 8.4Hz, 1.6Hz, H-6')
5.94	(1H, s, H-6)
5.43	(1H, dd, J = 11.8Hz, 3.2Hz, H-2)
3.80	(s, OCH <sub>3</sub> )
3.17	(1H, dd, J = 17Hz, 11.6Hz, H-3 <sub>ax</sub> )
2.76	(1H, dd, J = 17Hz, 3.2Hz, H-3 <sub>eq</sub> )
FAB-MS (m/z)	319 [M+H] <sup>+</sup>

【0032】

【表2】

<sup>13</sup> C NMR	
C	δ
2	80.6
3	44.1
4	197.7
5	158.0
6	96.7
7	157.6
8	126.8
9	150.3
10	103.2
1'	133.1
2'	112.6
3'	147.7
4'	149.4
5'	114.8
6'	119.3
Me	56.5

その結果、前記ヘスペリジン変換物は、上記化3で示される構造を有する8-ヒドロキシヘスペレチンであることが確認された。

【0033】さらに、前記実施形態より把握できる技術

的思想について以下に記載する。

・ 前記微生物発酵処理を0.01～5容量%のジメチルスルフォキシドを含有する培地中で行うことを特徴とする請求項3又は請求項4に記載のフラボノイド化合物の製造方法。このように構成した場合、アスペルギルス・サイトイの生育阻害を低減させつつ、比較的多量のヘスペリジンを培地中に溶解させて、その微生物変換効率を容易に高めることができる。

【0034】・ さらに前記微生物発酵処理後の培養上澄み液を、疎水性カラムを用いた逆相液体クロマトグラフィーにより精製することを特徴とする請求項3又は請求項4に記載のフラボノイド化合物の製造方法。このように構成した場合、極めて容易にフラボノイド化合物を単離することができる。

【0035】

【発明の効果】以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。請求項1及び請求項2に記載の発明のフラボノイド化合物によれば、ヘスペリジンの利用範囲の拡大を図ることができる。

【0036】請求項3及び請求項4に記載の発明のフラボノイド化合物の製造方法によれば、ヘスペリジンの利

用範囲の拡大を図ることができるフラボノイド化合物を 容易に製造することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	ターム(参考)
A 6 1 P 31/12		A 6 1 P 31/12	
	37/08		37/08
(C 1 2 P 17/06		(C 1 2 P 17/06	
C 1 2 R 1:66)		C 1 2 R 1:66)	
(72)発明者 三宅 義明		F ターム(参考)	4B018 MD08 ME07 ME09 ME14 MF13
愛知県西春日井郡師勝町大字熊之庄字十二			4B064 AE46 BA04 BH04 BH05 BH07
社45-2 株式会社ポッカコーポレーショ			CA05 CB07 CB12 CC03 CD09
ンR&D部門内			DA10
(72)発明者 大澤 俊彦			4C062 EE56
愛知県名古屋市東区徳川町2615-409			4C086 AA03 AA04 BA08 NA02 NA14
(72)発明者 湊 健一郎			ZA45 ZB13 ZB26 ZB33 ZC28
愛知県名古屋市西区市場木町164-203			ZC29 ZC33 ZC35